

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/>	Format Free
--	---	--	---	---	----------------

1. ☐ 2/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011228724

WPI Acc No: 1997-206627/199719

XRAM Acc No: C97-066319

Regeneration of immobilised lipase - by feeding immobilised lipase of lowered transesterification activity to water-contg. polar solvent

Patent Assignee: FUJI SPINNING CO LTD (FUJN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9056379	A	19970304	JP 95233318	A	19950818	199719 B
JP 2824900	B2	19981118	JP 95233318	A	19950818	199851

Priority Applications (No Type Date): JP 95233318 A 19950818

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9056379	A		5	C12N-011/02	
JP 2824900	B2		5	C12N-011/02	Previous Publ. patent JP 9056379

Abstract (Basic): JP 9056379 A

Regeneration of immobilised lipase in which immobilised lipase transesterification activity of which is decreased to lower than one tenth of initial activity is fed in polar solvent contg. 1-5% water to regenerate its enzymatic activity.

ADVANTAGE - Method can regenerate immobilised lipase, efficiently.

In an example, 1200g of chitosan having deacetylation degree of 80% and average. Mol.wt. of 60000 was dissolved in 1880g of 3.5% aq. acetic acid. Soln. was dropped in coagulating soln. contg. 7% NaOH, 20% ethanol and 73% water to give granular porous chitosan. It was washed with water to give 100ml of wet regenerated granular porous chitosan carrier. 800ml of water and 4.184g ethylene glycol diglycidyl ether were added to 800ml of carrier and heated at 60deg.C for 1 hr. to crosslink it. Then it was washed with water to give 800ml of crosslinked regenerated granular porous chitosan carrier. It was fully dehydrated with DMA. Stearoyl chloride was reacted with it to introduce stearoyl gp. 10g of wet carrier was fed to enzyme soln. contg. 100mg lipase originated from Chromobacterium viscosum in phosphate buffer and stirred at 37deg.C for 1 hr. It was immobilised with glutaraldehyde to give immobilised lipase.

Dwg. 0/0

Title Terms: REGENERATE; IMMOBILISE; LIPASE; FEED; IMMOBILISE; LIPASE; LOWER; TRANSESTERIFICATION; ACTIVE; WATER; CONTAIN; POLE; SOLVENT

Derwent Class: D16

International Patent Class (Main): C12N-011/02

International Patent Class (Additional): C12N-009/20; C12N-011/14

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/>	Format Free
--	---	--	---	---	----------------

© 2003 Dialog, a Thomson business

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-56379

(43) 公開日 平成9年(1997)3月4日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 N 11/02
11/14

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 11/02
11/14

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平7-233318

(22) 出願日

平成7年(1995)8月18日

(71) 出願人

000005359

富士紡績株式会社

東京都中央区日本橋人形町1丁目18番12号

(72) 発明者

川村 佳秀

静岡県駿東郡小山町小山89-5

(72) 発明者

谷邊 博昭

静岡県駿東郡小山町藤曲146-3

(74) 代理人

弁理士 大野 克躬 (外1名)

(54) 【発明の名称】 固定化リパーゼの再生方法

(57) 【要約】

【課題】 固定化リパーゼを、水が存在しないか存在しても極微量である有機溶剤中でエステル結合の転移反応に触媒として使用後、活性が低下した固定化リパーゼを再生し、再利用する。

【解決手段】 エステル転移反応の活性が、初期活性の10分の1を越えないまで低減した固定化リパーゼを、1~5%の水を含む極性溶剤中に入れ、酵素活性を再生させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エステル転移反応の活性が初期活性の10分の1を越えないまで低減した固定化リパーゼを、1～5%の水を含む極性溶剤中に入れ酵素活性を再生させる固定化リパーゼの再生方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【0001】

【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は、水が存在しないか存在しても極微量である有機溶剤中で、エステル結合の合成および交換反応に触媒として用いた際に、活性が低減した固定化リパーゼを再生し再利用する方法に関するものであり、固定化リパーゼを用いて光学分割や不斉合成を行い液晶原料や医薬、農薬等の生理活性物質を効率的に合成する手段を提供するものである。

【0003】

【0002】

【0004】

【従来の技術】近年、酵素や微生物といった生体触媒を有機溶剤中で用い、光学活性物質を製造する研究が活発に行われている。特に、リパーゼは、有機溶液中でエステルに関連する多くの反応に優れた触媒活性を示すことから、最も注目される生体触媒の一つである。この際、リパーゼは有機溶剤に溶解せず基質と有効に反応しない。また高価なリパーゼを有効に利用したいという要求からリパーゼの固定化が盛んに試みられてきた。

【0005】

【0003】固定化リパーゼを有機溶剤中で働かせるとき、溶剤中の水の存在が酵素活性に大きな影響を与える事は周知の事実である。しかし溶剤中の水の量が多いと加水分解反応が優先し、エステルの移転反応や合成反応が起こらない。その結果、固定化リパーゼの反応は水が存在しないか、存在しても極微量である有機溶剤中で行われるが、長期間の反応でリパーゼの近傍に存在する水が有機溶剤に取られることでリパーゼは徐々に活性が低下する。やがては失活し、失活した固定化リパーゼは廃棄せざるを得なかった。

【0006】

【0004】

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は水が存在しないか存在しても極微量である有機溶剤中でエステル結合の転移反応に触媒として使用した際に、一旦活性が低下した固定化リパーゼを再生し、再利用する方法を提供するものである。

【0008】

【0005】

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を

行い、固定化リパーゼを、有機溶剤中での繰り返しの反応、もしくは連続反応に使用して、長期に渡ってエステル結合の分解、合成および交換反応に触媒として使用する際に、固定化されたリパーゼから水分子が脱離し失活することを見出し、本発明に到達した。即ち、本発明はエステル転移反応の活性が初期活性の10分の1を越えないまで低減した固定化リパーゼを1～5%の水を含む極性溶剤中に入れ、酵素活性を再生させる固定化リパーゼの再生方法である。

【0010】

【0006】

【0011】

【発明の実施の形態】本発明で用いる固定化リパーゼにおいて、リパーゼを固定化する担体としては、セライト、ケイソウ土、パーライト、シリカゲル、活性炭、セルロースパウダー、再生粒状多孔質キトサン担体、ポリスチレンおよびジビニルベンゼンを母体とするイオン交換樹脂、またはキレート樹脂等が挙げられる。特に特開平7-87974号公報で開示した、高級脂肪酸を導入した架橋再生粒状多孔質キトサン担体にリパーゼを固定化した固定化リパーゼの場合に活性の回復が著しく、極めて優れた効果を発揮する。

【0012】

【0007】固定化されるリパーゼは特に限定されるものではなく、ブタ肝臓、ブタ脾臓由来リパーゼの他、リゾプス (*Rhizopus*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、ゲオトリウム (*Geotrichum*) 属、カンディダ (*Candida*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 等の細菌、糸状菌、酵母由来のものが挙げられる。

【0013】

【0008】また活性の低減した固定化リパーゼを処理する際に使用する極性溶剤としては、リパーゼを失活させない有機溶剤であれば良く、アセトン、ジオキサン、アルコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド等が挙げられるが、アセトンまたはジオキサンが最も有効である。

【0014】

【0009】固定化リパーゼを再生処理する極性溶剤に溶解した水の濃度としては1～5%が好適である。水が1%未満では再生の効果が低く、5%を越える濃度の水が含まれていると再生操作後も固定化リパーゼに多量の水が残留し、エステルの転移反応より分解反応が優先するので好ましくない。

【0015】

【0010】再生処理時の処理温度は5～50℃、好ましくは25～40℃が好適であり、その処理時間は1～

48時間、好ましくは10～20時間が好適である。処理する方法としては活性が低減した固定化リパーゼに対し再生処理液を通液処理する方法、また、含浸処理する方法等凡ゆる方法が採用出来る。尚、再生処理はエステル転移反応の活性が初期活性の10分の1を越える程度に低減した固定化リパーゼに適用させても活性の再生には有利ではない。

【0016】

【0011】

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例をあげて具体的に説明するが、本発明はこの範囲に限定されるものではない。

【0018】なお、固定化リパーゼのエステル転移反応の活性は以下の方法で測定し、エステル転移率として求めた。

【0019】

$$\text{エステル転移率 (\%)} = \frac{(\text{基質中R-}\alpha\text{-フェニルエチルアルコール量}) - (\text{流出液中R-}\alpha\text{-フェニルエチルアルコール量})}{\text{基質中R-}\alpha\text{-フェニルエチルアルコール量}} \times 100$$

【0022】

【0014】（実施例1）脱アセチル化度80%、平均分子量60,000のキトサン1200gを3.5%酢酸水溶液1880gに溶解した。該水溶液を、7%水酸化ナトリウム、20%エタノール、73%水よりなる凝固溶液中に落下し、キトサンを粒状多孔質に凝固再生し、中性になるまで充分水洗し、平均粒径0.1mmの再生粒状多孔質キトサン担体1000ml（湿潤）を得た。

【0023】

【0015】この再生粒状多孔質キトサン担体800mlに水800mlとエチレンジグリコールジグリシジルエーテル4.184gを加えて60℃で1時間架橋反応させた。反応終了後、水洗し、架橋再生粒状多孔質キトサン担体800mlを得た。

【0024】

【0016】架橋再生粒状多孔質キトサン担体が含む水をジメチルアセトアミドで充分に除去した。該架橋再生粒状多孔質キトサン担体100mlにジメチルアセトアミド100mlと4.544gの塩化ステアロイルと1.518gのトリエチルアミンを加え40℃で攪拌し10時間反応させた。

【0025】

【0017】反応残液を除去したのち、ジメチルホルムアミドで洗浄し、次いでジメチルアセトアミドを純水で除去し塩化ステアロイルを導入した架橋再生粒状多孔質キトサン担体を得た。

【0026】

【0018】湿潤状態の担体を湿重で10gとり、クロモバクテリウムビスコスム由来のリパーゼ（旭化成工業（株）製、商品名T-01）100mgを溶かした水溶液

【0012】（活性測定方法）

1) 乾燥固定化リパーゼを内径0.4cm、長さ5cmのステンレスカラムに充填する。

2) 10%のR、S- α -フェニルエチルアルコールと4%のビニルアセテートと100ppmの水を含むヘキサン溶液を基質とし、温度25℃、空間速度5hr⁻¹でカラムに通液する。

3) 基質とステンレスカラムからの流出液を光学分割カラム（ダイセル化学工業（株）製、商品名キラルセルOB）で分析し、流出液中のR- α -フェニルエチルアルコール量を測定する。

4) エステル転移率を次式により計算する。

【0020】

【0013】

【0021】

【数1】

10ml、1M-リン酸緩衝液（pH7.5）を5ml、純水を235ml混合して酵素液とし、担体を入れた。37℃で1時間攪拌しリパーゼを担体に吸着させた後、担体を濾別しよく水洗した。1M-リン酸緩衝液（pH7.5）を5ml、純水を242.5ml、1%グルタルアルデヒド水溶液を2.5ml混合し固定液とし、固定液にリパーゼ吸着後の担体を入れ、37℃で1時間攪拌し、リパーゼを担体と共有結合で固定化した。リパーゼを固定化させた担体を濾別し、よく水洗し、湿潤固定化リパーゼを得、アセトンで固定化リパーゼに含まれる水を十分に除去脱水し、真空乾燥することにより水分率5%の乾燥固定化リパーゼを得た。

【0027】

【0019】得られた乾燥固定化リパーゼを5本のステンレスカラムに夫々充填し、活性測定方法に記述したエステル転移反応を行い、エステル転移反応の活性を測定したところ、初期のエステル転移率は75%、800時間後のエステル転移率は25%であった。

【0028】

【0020】次いで5本のカラムそれぞれに表1に示す水を含むアセトンをそれぞれ25℃で18時間流し再生処理をした。

【0029】

【0021】

【0030】

【表1】

実験番号	水分濃度
1	0.5%
2	1.0%
3	3.0%
4	5.0%
5	8.0%

【0031】

【0022】再度、上述と同様のエステル転移反応を行い、エステル転移反応の活性を測定したところ表2の通りであった。

【0032】

【0023】

【0033】

【表2】

実験番号	エステル転移率
1	21%
2	58%
3	65%
4	63%
5	28%

20

実験番号	通液時間	初期エステル転移率	所定時間後エステル転移率
6	600時間	70%	35%
7	1500時間	70%	20%
8	2000時間	70%	12%
9	2500時間	70%	7%
10	3000時間	70%	3%

【0038】

【0027】次に5本のカラムそれぞれに3%の水を含むアセトンをそれぞれ25℃で18時間流し再生処理をした。

【0039】再度、エステル転移反応を夫々について同様に行いエステル転移反応の活性を測定したところ、エステル転移率は表4の通りであった。

【0040】

【0028】

【0041】

【表4】

実験番号	エステル転移率
6	65%
7	64%
8	60%
9	23%
10	10%

40

【0034】

【0024】この結果から明らかなように1~5%の水を含むアセトン溶液を流すことにより、固定化リパーゼを効果的に再生することができた。

【0035】

【0025】（実施例2）実施例1と同様の方法で水分率5%の乾燥固定化リパーゼを得、ステンレスカラム5本に充填した。実施例1と同様にエステル転移反応を行い、エステル転移反応の活性を測定したところ、初期のエステル転移率と所定時間後のエステル転移率は表3の通りであった。

【0036】

【0026】

【0037】

【表3】

10

【0042】

【0029】再生後の固定化リパーゼを用い、更に同様のエステル転移反応を行って、エステル転移反応の活性を測定したところ、所定時間後のエステル転移率は表5の通りであった。

50

【0043】

【0030】

【0044】

【表5】

実験番号	通液時間	所 定 時 間 後 エステル転移率
6	600時間	25%
7	1500時間	17%
8	2000時間	8%
9	2500時間	2%
10	3000時間	1%

【0045】

【0031】次に5本のカラムそれぞれに3%の水を含むアセトンをそれぞれ25℃で18時間流し再生処理した。

【0046】再々度エステル転移反応を行ってエステル転移反応の活性を測定したところ、エステル転移率は表6の通りであった。

【0047】

【0032】

【0048】

【表6】

実験番号	エステル転移率
6	48%
7	40%
8	24%
9	12%
10	5%

【0049】

【0033】この結果から明らかなように、実験番号6～8の如くエステル転移反応の活性が初期活性の10分の1を越えないまで低減した固定化リパーゼに、水を含むアセトン溶液を流すことにより、固定化リパーゼを効果的に再生することができるが、実験番号9、10の如くエステル転移反応の活性が初期活性の10分の1を越えているものは再生、再々生してもエステル転移反応の活性は充分復活していない。

【0050】

【0034】（実施例3）実施例1と同様の方法で水分率5%の乾燥固定化リパーゼを得、内径0.4cm、長さ

5cmのステンレスカラム2本に同じ量充填した。実施例1と同様のエステル転移反応を行い、エステル転移反応の活性を測定したところ、初期のエステル転移率は70%、800時間後のエステル転移率は15%であった。

【0051】

【0035】次に1本のカラムには2%の水を含むジオキサン、もう一方のカラムには5%の水を含むジオキサンをそれぞれ25℃で18時間流し再生した。

【0052】再度、同様にエステル転移反応を行い、エステル転移反応の活性を測定したところ、エステル転移率は2%の水を含むジオキサンの場合48%、5%の水を含むジオキサンの場合52%であり、固定化リパーゼが効果的に再生されていた。

【0053】

【0036】（実施例4）担体として日本錬水（株）

製、商品名ダイヤイオンHP21とダウケミカル（株）製、商品名ダウエックスMWA-1を用いてそれぞれ湿重で10gとり、実施例1と同様の方法でクロモバクテリウムビスコム由来のリパーゼ（旭化成工業（株）製、商品名T-01）を固定化した乾燥固定化リパーゼを得た。

【0054】

【0037】得られた乾燥固定化リパーゼを用い、実施例1と同様の方法でエステル転移反応を行い、その活性を測定したところ、ダイヤイオンHP21の初期のエステル転移率は8%、800時間後のエステル転移率は2%、ダウエックスMWA-1の初期のエステル転移率は8%、800時間後のエステル転移率は1.5%であった。

30 【0055】

【0038】次にそれぞれのカラムに5%の水を含むアセトンを25℃で18時間流し再生した。再度、エステル転移反応を同様にを行い、エステル転移反応の活性を測定したところ、エステル転移率はダイヤイオンHP21の場合5%、ダウエックスMWA-1の場合4.5%であり、固定化リパーゼが初期より活性は低いがそれなりに効果的に再生された。

【0056】

【0039】

40 【0057】

【発明の効果】有機溶剤中でエステル結合の転移反応に触媒として用いた際に、活性が初期活性の10分の1を越えないまで低減した固定化リパーゼを、1～5%の水を含む極性溶剤中に入れ酵素活性を再生させると効率的に固定化リパーゼが再生できる効果がある。